抗中心粒胞浆抗体（多重微珠免疫法）试剂盒
说　明　书

一、【产品名称】

中文名称：抗中心粒胞浆抗体（多重微珠免疫法）试剂盒

英文名称：AtheNA Multi-Lyte MPO/PR3 IgG TEST SYSTEM

二、【包装规格】 96 次/盒

三、【预期用途】

宙斯（Zeus）科技公司的 **AtheNA Multi-Lyte®**抗中心粒胞浆抗体检测试剂盒是定性或半定量地检测人血清中 2 个 ANCA 抗原(髓过氧化物酶和蛋白酶 3）的 IgG 抗体的检测系统。本试剂盒可以检测由于 ANCA 水平提高引起的各类自身免疫的脉管炎病变。MPO 和 PR3 可能与自身免疫病变有关如 Wegener's 肉芽肿瘤、ICGN、MPA、PRS。本试剂盒仅用于体外诊断。

四、【检验原理】

宙斯公司的**AtheNA Multi-Lyte**抗中心粒胞浆抗体检测系统用来检测人血清中 PR3 和 MPO 的 IgG 抗体。整个检测步骤包括两步温育过程。

1、待测血清（经过稀释）与复合悬浮微珠在孔中温育。复合悬浮微珠为不同荧光编码的聚苯乙烯微粒（polystyrene microspheres); 不同颜色的微粒上结合有不同的抗原。病人血清中的特异性抗体会和免疫抗原在一个或多个微珠系统结合，并除去非特异性血清蛋白。

2、加入荧光素(藻红蛋白)（Phycoerythrin，PE）标记的羊抗人 IgG（γ链） 继续进行温育。结合剂会与通过上一步反应固定在微粒表面的 IgG 抗体结合。用 **AtheNA Multi-Lyte** 设备对微粒悬浮液进行分析。仪器可以辨认出不同颜色的微粒，并测量出每个颗粒上的荧光强度(PE)。利用孔内校正技术（*Intra-Well Calibration Technology™*），内对照颗粒上的荧光信号可以将读到的荧光强度转换成浓度（单位）结果。

五、【主要组成成份】

A、活性成分：（所有活性成分都含有浓度为 0.1% w/v 的叠氮钠作为防腐剂。）

1、复合悬浮微珠。可以直接使用，5.8ml 一瓶。悬浮液中包含有可辨识的 5.6 微米的结合有 MPO 和 PR3 抗原的聚苯乙烯颗粒，另外微珠的混合物也包括一套能在病人标本中检测出非特异性抗体的系统和四套校正系统。

2、 荧光素标记的羊抗人 IgG（γ链）。可以直接使用，15ml，琥珀色瓶子。

3、 人阳性血清对照：0.2ml 1 管。

4、 人阴性血清对照：0.2ml 1 管。

5、 样本稀释液：50ml 一瓶含磷酸缓冲盐，可以直接使用。
注：样本稀释液加入血清后会变色（指示标本已稀释）。

6、 10X 浓缩洗涤液：50ml，含磷酸缓冲盐。使用时需按 1 份浓缩洗涤液加 9 份蒸馏水或去离子水稀释。

B、非活性成分：

1、 96 孔过滤板一块

2、 96 孔聚苯乙烯分析板一块

3、 96 孔稀释盘一块

4、 数据标签：一张标签贴于试剂盒盖内，另一张在试剂盒内。

5、 使用说明书中文版和英文版各 1 份

6、 校正 CD1 张。包括所有批间特异性的试剂盒校正值，用于标本分析和质量控制。

六、【其它所需物品和仪器】

1、 能精确吸取 10 到 200ul 的移液器；

2、 能精确吸取 50-200 ul 多通道移液器（选配）；

3、 适用于多通道移液器的贮液槽（选配）；

4、 一次性吸头；

5、 计时器，以便控制温育时间；

6、 AtheNA Multi-Lyte®系统(Luminex®仪器)。

7、 真空抽滤泵；

8、 超声仪；

9、 蒸馏水或去离子水。

七、【储存条件和有效期】

1、 未开封的试剂盒：保存在 2-8°C，有效期 18 个月。

2、 多重微珠悬浮液：保存在 2-8°C。使用时吸取需要量后将之放回 2-8℃。

3、 PE 标记的羊抗人 IgG：保存在 2-8°C。

4、 人血清对照：保存在 2-8°C。

5、 样品稀释液：保存在 2-8°C。

6、 浓缩洗涤液（10X）：保存在 2-25 ℃。已稀释的洗涤液（1X）在 20-25 ℃ 保存 7 天，在 2-8 ℃ 可保存 30 天。

7、 试剂盒失效期：见数据标签。

八、【适用仪器】

AtheNA Multi-Lyte®系统(Luminex®仪器)

九、 【样品要求】

本试验选用的标本为无菌静脉穿刺取得的血液，经新鲜沉降和冷藏获得的血清。不得使用抗凝剂和防腐剂。避免使用溶血、脂血和细菌污染的血清。

标本在室温保存不得超过 8 小时。如果 8 小时内不进行检测，应把血清保存在 2-8°C 最多 48 小时。如时间更久，应把标本放在-20°C 或更低。不要反复冻融标本以免造成抗体活力降低并影响最终结果。

建议根据 NCCLS 的 M29 号文件来采集标本（接触有传染性疾病的实验室工作者的防护）。没有已知的试验方法可以完全证明人的血液标本不会导致感染，因此，所有的血液都应视为有潜在的传染性。

十、【检验方法】

简明操作步骤：

步　骤	操　作
1	**室温平衡：**把各成分从储存条件中取出使之回复至室温（20-25℃）。 确定试验所需对照和标本总的数量。每次试验都应设阴性对照和阳性对照。阴性对照应设在 A1 孔，阳性对照在 B1 孔。每个对照和标本都需要一个微孔。
2	稀释标本：在 96 孔稀释盘上将阴阳性对照和标本用样本稀释液按 1:21 进行稀释(例如取 10ul 标本与 200ul 样本稀释液)。充分混匀（参考下面的注 2）。
3	在确定检测所需的总数量后，取出抽滤板，使用多通道移液器或重复使用移液器向各孔内加入 50μl 微珠悬浮液；再将已 1:21 稀释的样本各取 10ul 依次加入到微孔板的各孔内。充分混匀（参考下面的注 2）。
4	室温（20-25℃）温育 30±10 分钟。
5	洗涤：将 10X 浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水 10 倍稀释成 1X 洗涤液，温育后，按以下步骤对微珠进行洗涤。 A、 将抽滤盘放在真空抽滤泵的托盘上，打开真空抽滤泵，移除孔内溶液，只剩下微珠在板的底部。 B、 关闭真空泵，向抽滤盘的各孔内加入 200ul 鞘流液。 C、 再次使用真空泵移除溶液。 D、 重复 B、C 步骤，总共需要进行三次洗涤。
6	每孔加 150μl 结合剂(PE 标记的羊抗人 IgGγ链)，混匀。
7	室温温育 30±10 分钟。
8	**读数：**60 分钟内通过 Luminex® 仪器读取结果，读数之前振荡微孔板大约 15 秒

注意事项：

注 1：微珠悬浮液在使用前应彻底混匀以获得最佳读取结果时间。最有效的方法是将微珠悬浮液振荡 30 秒然后超声仪处理 30 秒。

注 2：各试剂在使用时应彻底混匀。较合适的方法包括将微孔板放在混旋器上以约 800RPM 混匀 30 秒，或使用移液器吸取约 1/2 体积的反应液体反复吸打至少 5 次。

注 3. .血清标本加入到样本稀释液后发生颜色变化，这是用来指示标本已经与稀释液结合。正确的操作要求样本稀释液混合均匀，可按上述**注 2** 操作。

十一、【结果判断】

1、校正

AtheNA Multi-Lyte 抗中心粒胞浆抗体检测系统设备应用的是孔内校正技术（*Intra-Well Calibration Technology™*)。该技术利用微珠悬浮液形成一多点标准曲线，试验时的每个孔都会自动进行校正，标准曲线对病人标本和对照血清做唯一的自我调整。内标的校正值由宙斯公司提供，该校正值有批间特异性并标于每批产品的校正 CD 中。

2、cutoff 值：

本试剂盒的每次分析都有一个 cutoff 值，cutoff 值由宙斯公司确定，有批间特异性并标于每批产品的校正 CD 中。

3、单位值：

通过孔内校正技术，AtheNA Multi-Lyte 系统自动计算结果。孔内校正技术对内标做回归分析，并通过附加标准和血清标本的特征值调整计算出来的单位值。

4、ANCA 结果判断：

本试剂盒的试验结果分析可按下述标准判断：

	单位值
阴性标本	<100AU/ml
阳性标本	>120AU/ml
可疑标本	100-120 AU/ml

十二、【检验结果的解释】

1、 ANCA 最初由 Davies 等人在 1982 年提出（1）。以后，研究发现 ANCA 与一系列系统性脉管炎病变（SV）有关。ANCA 包括两种：C-ANCA 抗 PR3，P-ANCA 抗 MPO。建议有 SV 临床症状的病人一定要检测 C-ANCA 和 P-ANCA。与 ANCA 有关的临床综合症主要有以下几种：Wegener’s 肉芽肿瘤（2）、多发性动脉炎（3）、脉管炎（4）、原发性新月型肾小球性肾炎（5）、川崎病（6）。

2、 外部控制应能够代表普通人的血清，因为 AtheNA 的校正系统建立于血清样品。如果是人工设立的而非人血清标本则可能导致错误结果。

十三、【质量控制】

1、 阴性对照结果应为阴性。

2、 阴性对照对多重微珠悬浮液中每个指标都应为阴性。

3、 阳性对照对 ANCA 结果应为阳性。除了该定性结果，阳性对照的结果值应符合先前确定的范围，这些范围值在校正 CD 中。

4、任何一个标准不符合，整个试验就应判为无效而需重复。

5、标本检测的有效性取决于校正微珠及其与病人血清的反应情况，通过孔内校正技术可以对各参数自动调整。任一标准不符合即可视为试验无效需重复。如果发生此类情况，数据报告会发出提示。

6、本质量控制参照 NCCLS 的 C24 号文件：定性测试的统计学质量控制。

十四、【预期值】

本试剂盒的临床测试包括临床检测包括 122 例要做常规 ANCA 检测的标本，173 例已确诊的病人标本和 150 例普通献血标本组。结果见下表。

表 1：

组别	分析	数量		AtheNA 结果			
				无效	可疑	阳性	阴性
常规	MPO	122	数量	2	2	21	97
			%	1.6	1.6	17.2	79.5
	PR3	122	数量	2	2	50	68
			%	1.6	1.6	41.0	55.7
临床	MPO	173	数量	1	2	104	66
			%	0.6	1.2	60.1	38.2
	PR3	173	数量	1	6	104	62
			%	0.6	3.5	60.1	35.8
普通	MPO	150	数量	0	1	9	140
			%	0.0	0.7	6.0	93.3
	PR3	150	数量	0	6	27	117
			%	0.0	4.0	18.0	78.0

表 2：

组 别	分析	AtheNA 结果			
		平均结果	中等结果	范 围	
				低 值	高 值
常 规	MPO	211.6	35.5	0	1887
	PR3	396.3	73	5	3405
临 床	MPO	272	50	14	2451
	PR3	267.2	62	18	3041
普 通	MPO	53	35	0	684
	PR3	128	57	0	1636

十五、【灵敏度和特异性】

我们用本试剂盒与另一家公司的 ELISA 试剂盒同时检测了 445 个血清标本。150 例是普通的献血者标本，122 例是待做常规 ANCA 检测的标本，173 例是已确诊为 SV 的病人标本。试验结果见表 3 和表 4。试验结果见表 3 和表 4。

表 3：AtheNA MPO IgG 与 MPO IgG ELISA 结果比较

AtheNA 结 果		ELSIA 结 果			总 计
		阳 性	阴 性	可疑	
	阳 性	55	39	2	96
	阴 性	2	338	1	341
	可 疑**	1	4	0	5
	总 计	59	383	3	445

相对灵敏度：55/57 = 96.5%　　相对特异性：338/377 = 89.6%

相对符合率：393/434 = 90.6%

表 4：AtheNA PR3 IgG 与 PR3 IgG ELISA 结果比较

AtheNA 结 果		ELSIA 结 果			总 计
		阳 性	阴 性	可疑	
	阳 性	85	53	1	139
	阴 性	6	283	0	289
	可 疑**	4	10	0	14
	总 计	96	348	1	445

相对灵敏度：85/91 = 93.4%　　相对特异性：283/336 = 84.2%

相对符合率：368/427 = 86.2%

*注：可疑标本在统计时剔除在外。

交叉反应和干扰物质试验：

本试剂盒用血清中的其他物质做交叉试验，共检测了 35 个标本。15 个是对不同自身免疫和感染性疾病的抗体阳性的。其中 1 个 AtheNA Multi-Lyte MPO 分析是有活性的，同时 PR3 检测也为阳性。

其他 20 个标本中含潜在影响物质。有溶血素含量异常（n=5），胆红素含量异常（n=5），IgG 浓度偏高（n=5）或脂质含量偏高（n=5）。在这 20 个标本中，2 个用本试剂盒 MPO 和 PR3 检测都是阳性。

十六、【检验方法的局限性】

1、本试剂盒不能作为唯一的诊断依据，试验结果应结合临床评价和其他诊断方法结果进行病情判断。

2、溶血、脂血等血清标本会影响结果的判断，另外标本中 IgG 浓度异常的也会有影响，因此要避免使用此类标本。

十七、【注意事项】

1、 本试剂盒用于体外诊断。

2、 稀释或掺杂其他试剂会导致错误的结果。

3、 请勿使用其他厂家的试剂。

4、 微珠悬浮液和结合剂是光敏感的试剂，都装于避光容器内。在试验过程中常规光条件下并不会影响试验结果，但应避免将之暴露于不必要的强光下。

5、 微珠悬浮液在使用前应彻底混匀以获得最佳读取结果。最有效的方法是将微珠悬浮液振荡 30 秒然后超声仪处理 30 秒。

6、 小心操作，避免试剂和病人样品与操作者皮肤或粘膜接触。

7、 避免试剂被微生物污染，这将产生错误的结果。

8、 试剂和样本的交叉污染会导致错误的结果。

9、 严格按照说明书中指定的温育时间和温度操作是获得正确结果的重要保证。实验前一定要使所有试剂的温度回复至室温（20~25℃）。没有用完的试剂应立即放回到冰箱。

10、 避免溶液飞溅或产生气溶胶。

11、 废弃溶液用 10%的家用漂白剂（0.5%次氯酸钠）处理。避免试剂与漂白剂的烟雾接触。

12、 不要让任何反应试剂接触到含有漂白剂的溶液。微量的漂白剂（次氯酸钠）会影响试剂盒内很多试剂的生物活性。

十八、【参考文献】

1. Davies D, Moran ME, Niall JF, Ryan GB: Segmental glomerulonephritis with a antineutrophil antibody: Possible arbovirus aetiology. Br.J. Med. 285:606, 1982
2. Van der Woude FJ, Rasmussen N, Lobatto S, Wiik A, Permin H, wan Es LA: Autoantibodies against neutrophils and monocytes: Tools for diagnosis and marker of disease activity in Wegener’s Granulomatosis. Lancet 1:425-429, 1985
3. Feehally J, Wheeler DC, Walls J, et al: A case of microscopic polyarteritis associated with antineutrophilia cytoplasmic antibodies. Clin. Nephrol. 27: 214-215, 1987
4. Falk RJ, Becker M, Terrell R, Jennette JC: Antigen specificity of P-ANCA and C-ANCA (Abstract). The 3rd International Workshop on ANCA, Washington, DC 1990:2-3
5. Jennette JC, Falk RJ: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis, N. Engl. J. Med. 318: 1651-1657, 1988
6. Savage COS, Tizard J, Jayne D, et al: Antineutrophil cytoplasmic antibodies in Kawasaki disease. Arch. Dis. Child. 64:360-363, 1989
7. Procedures for the collection of diagnostic blood specimens by venipuncture. Second Edition: Approved Standard (1984). Published by National Committee for Clinical Laboratory Standards.
8. Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens. NCClS Document H18-A, Vol. 10, No. 12, Approved Guideline, 1990.
9. U.S. Department of Labor, Occupational Safety and Health Administration: Occupational Exposure to Bloodborne Pathogens, Final Rule. Fed. Register 56:64175-64182, 1991

【生产企业】

企业名称：美国 Zues Scientific，Inc

注册地址：200 Evans Way，Branchburg，New Jersey

生产地址：200 Evans Way，Branchburg，New Jersey

【进口医疗器械注册证书编号】

国食药监械(进)字 2010 第 2401785 号

【产品标准编号】

YB/USA 0694-2010

【中国总代理】

上海朗卡贸易有限公司

Email：yidizhun@126.con

【说明书批准及修改日期】2010 年 8 月 22 日